

УДК 616-099:547.271:547.422.22]-092.9

Ю.К. Резуненко

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

## ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ МЕТИЛКАРБІТОЛУ ТА МЕТИЛЦЕЛЛОЗОЛЬВУ З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

У роботі вивчено токсичність метилкарбітолу та метилцеллозольву, що характеризуються великим об'ємом виробництва, широким використанням, надходженням до водних об'єктів довкілля, можливою негативною дією на організм людини. Для теплокровних тварин метилцеллозольв є помірно токсичною речовиною зі значно вираженою кумуляцією, метилкарбітол – малотоксичною зі слабовираженими кумулятивними властивостями. За умов гострого отруєння досліджувані сполуки порушують функції ЦНС, дихання та кровообігу. Культури клітин J<sub>929</sub> і X-63 більш чутливі до дії речовин, що підтверджується суттєвим порушенням процесу їх розплавлення, зниженням включення <sup>3</sup>H-тимідину і <sup>3</sup>H-уридину, негативного заряду ядер букального епітелію людини.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** метилкарбітол, метилцеллозольв, токсичність, кумуляція, теплокровні тварини, клітинні культури.

**ВСТУП.** Сполуки метилкарбітол (МК)  $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OH}$  і метилцеллозольв (МЦ)  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  характеризуються великим об'ємом виробництва, широким застосуванням у різних галузях промисловості й сільськогосподарства як розчинників, абсорбентів, ефективних агентів при екстракції та екстрактивній ректифікації, антикорозійних сполук, а також необхідних компонентів для синтезу полієфірів [9]. Зі стічними водами промислових підприємств ці речовини надходять до водоймищ, у тому числі джерел господарсько-питного та культурно-побутового призначення, і можуть мати несприятливий вплив на умови водокористування та організм людини. Вищезазначене зумовлює актуальність та доцільність всебічного вивчення МК і МЦ з метою обґрунтування та створення наукової основи для розробки еколого-профілактичних заходів із захисту здоров'я населення, факторів довкілля від їх несприятливого впливу [7, 9]. Біологічна та токсикологічна оцінка хімічних речовин, обмеження до безпечних рівнів впливу у виробничому та навколишньому середовищі включає великий діапазон досліджень, серед яких обов'язковим є встановлення летальних ефектів, кумулятивних властивостей, шкірно-подразнювальної,

© Ю.К. Резуненко, 2011.

шкірно-резорбтивної, сенсibiliзуювальної дій на організм тощо [2]. Експериментальні дослідження такого напрямку проводять, як правило, на теплокровних тваринах, а також деякі з них можуть включати методи, в яких використовують клітини різних культур, штами бактерій, водні мікроорганізми.

Метою даної роботи було визначення параметрів токсичності, кумулятивності, видової чутливості, клінічної картини отруєння за умов перорального надходження МК і МЦ до організму теплокровних тварин та ступеня їх токсичності на тканинній культурі J<sub>929</sub> і X-63.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** У роботі використано хімічно чисті зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками, синтезовані та надані НВО "Синтез ПАВ" (м. Шебекіно, Росія). Дослідження токсичності сполук проводили на 48 статевозрілих щурах популяції Вістар масою  $(190 \pm 10)$  г і 48 білих мишах масою  $(23 \pm 2)$  г з урахуванням методичних підходів [1, 7]. Тваринам перорально за допомогою зонда вводили водні розчини речовин одноразово в діапазоні доз 1,0–15,0 г/кг маси у випадку гострого експерименту. Процедури з експериментальними тваринами здійснювали відповідно до вимог Державного комітету з етики. Тварин утриму-

вали в стаціонарних умовах віварію за постійної температури та природного освітлення. Забій проводили методом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію (50 мг/кг в/п) [8].

Клінічні прояви гострого отруєння вивчали з урахуванням методичних рекомендацій [1]. Дози було вибрано таким чином, щоб визначити летальний ефект в інтервалі летальних доз  $LD_0$ - $LD_{100}$ . Спостереження за тваринами проводили протягом 15 діб. Реєстрували час загибелі тварин і сумарну кількість введеної речовини. Оцінювали результати на підставі середнього ефективного часу загибелі тварин [5]. Розрахунок середньолетальних доз ( $LD_{50}$ ) здійснювали відповідно до [4, 5]. Загиблих тварин і тварин, які вижили, піддавали розтину з подальшим макро- та мікроскопічним дослідженням внутрішніх органів. Кумулятивні властивості речовин вивчали за методом Lim [12]. Коефіцієнти кумуляції визначали відповідно до [3]. Розрахунок коефіцієнта кумуляції проводили за формулою:  $K_k = (D_k \cdot 50) / (LD_{50} \cdot a \cdot n)$ , де  $D_k$  – сумарна доза, отримана всіма тваринами;  $n$  – число тварин;  $a$  – відсоток загиблих.

Токсикологічну оцінку МК і МЦ проводили також з використанням клітинних культур:  $J_{929}$  – лінії фібробластів мишей та Х-63 – мишачої мієломи. В експеримент брали культури клітин з вирослим моношаром, приготувані та вирощені за загальноприйнятою методикою [10]. Результати виражали за цитотоксичною дією – появою округлих клітин, зморщуванням або сповзанням зі скла. Для вивчення впливу речовин на функціональний стан (адгезію та розпластування) клітин використовували культуру  $J_{929}$ , яка росте на середовищі Ігла з 10 % розчином сироватки великої рогатої худоби. Клітини висівали в 96-лунковий планшет для культивування по  $10^5$  на лунку в ростовому середовищі з додаванням МК і МЦ. Результати оцінювали за кількістю клітин, які розпласталися в полі зору мікроскопа через

4 год. Через 24 год інкубації використовували також методику поглинання нейтрального червоного (кінцева концентрація в середовищі 0,01 %). Враховували відсоток клітин у лунці, які містять у цитоплазмі гранули барвника через 1 год після інкубації при 37 °С.

Вплив МК і МЦ на біосинтетичні процеси культури клітин Х-63 ( $5 \times 10^6$  на мл) вивчали радіоізотопним методом за включенням радіоактивних речовин у ТХО-нерозчинний осад. МК і МЦ додавали за 1 год до внесення радіоактивної речовини в середовище. Для вивчення синтезу ДНК і РНК використовували гідролізат  $^3H$ -тимідину (2,0 мСі/мл) та  $^3H$ -уридину (5,0 мСі/мл). Включення міток здійснювали при 37 °С та 5 %  $CO_2$  протягом 4-х год. Реакцію зупиняли шляхом додавання ТХО-кислоти. Проби обробляли на нітроцелюлозних фільтрах за загальноприйнятою методикою, радіоактивність вимірювали за допомогою лічильника “Бекман-7800”. Досліджували концентрації речовин 250,0 і 50,0 мг/л.

Забезпечували контакт МК і МЦ у різних концентраціях із нативними клітинами букального епітелію людини *in vitro* при експозиції протягом 20 хв. Про токсичний вплив судили за зміною біоелектричного потенціалу ядра [11]. Електрокінетичні властивості ядер клітин букального епітелію вивчали методом внутрішньоклітинного мікроелектрофорезу.

Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, незв’язаних вибірок використовували t-критерій Стюдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу варіант [6].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати досліджень свідчать про те, що МЦ належить до помірно токсичних сполук (3 клас небезпеки), а МК – до малотоксичних (4 клас небезпеки). Токсикометричні показники були близькими для різних видів лабораторних тварин і за ступенем небезпеки не виходили за межі 3 класу для МЦ та 4 класу для МК (табл. 1).

Таблиця 1 – Параметри токсичності метилкарбітолу та метилцеллозольву за умов одноразового внутрішньошлункового введення лабораторним тваринам

Речовина	Вид тварин	Параметр токсичності <sup>а</sup>			ET <sub>50</sub> <sup>б</sup>	Клас небезпеки
		LD <sub>0</sub>	LD <sub>50</sub>	LD <sub>100</sub>		
Метилкарбітол	щури	6,0	9,37	14,0	22,7	4
	миші	6,0	10,12	13,0	23,4	4
Метилцеллозольв	щури	1,25	1,50	2,5	19,3	3
	миші	1,0	1,42	2,5	20,1	3

Примітка. <sup>а</sup> – г/кг маси тварини; <sup>б</sup> – год.

За коефіцієнтами кумуляції МЦ відносять до речовин з помірно вираженою кумуляцією ( $K_k=3,62$ ), а МК має слабовиражені кумулятивні властивості ( $K_k=6,21$ ). Середній час загибелі тварин в основному вкладається у першу добу. Відмінностей видової чутливості не встановлено.

У клінічній картині отруєння МК і МЦ переважали симптоми порушення ЦНС. Зміни внутрішніх органів при гострому експерименті були подібними. Спостерігалися повнокров'я та дистрофія у печінці, нирках; редукція лімфої-

дних фолікулів, в окремих випадках – гіперплазія останніх у селезінці; перичелюлярний та периваскулярний набряки у головному мозку, стази у капілярах.

Слід зазначити, що досліджувані речовини проявляли біологічну активність відносно клітинних культур. Недіюча доза була встановлена на рівні 1,0 мг/л. Отримані результати свідчать про те, що культури клітин є більш чутливими до дії МК і МЦ. Речовини у концентраціях до 10,0 мг/л порушували процес розпластування клітин культури тканини фібробластів мишей  $J_{929}$  (табл. 2).

Таблиця 2 – Вплив метилкарбітолу та метилцеллозольву на розпластування клітин  $J_{929}$  після 4-х год інкубації

Речовина	Концентрація <sup>a</sup>			
	1000,0	100,0	10,0	1,0
Метилкарбітол	76±4	95±5	100±3	100 % утворення пласту
Метилцеллозольв	79±5	92±4	98±2	

Примітка. <sup>a</sup> – мг/л; вплив виражали у % клітин, що утворили пласт.

Також культури клітин втрачали здатність поглинати барвник нейтральний червоний (кінцева концентрація у середовищі 0,01 %) під впливом МК і МЦ, що є показником виживання клітин. Недіючою була концентрація 1,0 мг/л. Досліджувані сполуки у концентраціях 5,0 мг/л і нижче не впливали на час формування моношару (табл. 3).

МК і МЦ призводили до зниження включення у культури клітин  $^3\text{H}$ -тимідину і  $^3\text{H}$ -уридину (табл. 4, 5). Зміна інтенсивності інкорпорації  $^3\text{H}$ -тимідину і  $^3\text{H}$ -уридину залежала від дози впливу речовин. МК і МЦ у концентраціях

50,0 мг/л практично не впливали на включення  $^3\text{H}$ -тимідину в культуру клітин X-63, тоді як інкорпорація в них  $^3\text{H}$ -уридину значно знижувалася порівняно з контролем. В усіх випадках концентрація 5,0 мг/л не впливала на інкорпорацію  $^3\text{H}$ -тимідину та  $^3\text{H}$ -уридину і була недіючою на біосинтетичні процеси.

МК і МЦ знижували негативний заряд ядер букального епітелію порівняно з контролем (табл. 6). Спостерігалася залежність впливу речовин на електрокінетичні властивості ядер від дози. Концентрація 0,5 мг/л виявилася недіючою на нативні клітини букального епітелію.

Таблиця 3 – Вплив метилкарбітолу та метилцеллозольву на поглинання нейтрального червоного клітинами  $J_{929}$  після 24-х год інкубації

Речовина	Концентрація <sup>a</sup>			
	100,0	25,0	5,0	1,0
Метилкарбітол	90±4	98±4	100±4	–
Метилцеллозольв	86±5	100±4	100±4	

Примітка. <sup>a</sup> – мг/л; вплив виражали у % клітин, що поглинали барвник.

Таблиця 4 – Вплив метилкарбітолу та метилцеллозольву на включення  $^3\text{H}$ -тимідину в культуру клітин X-63 ( $M \pm m$ )

Речовина	Концентрація <sup>a</sup>	
	250,0	50,0
Контроль	30294±2328	
Метилкарбітол	15176±806*	29451±1478
Метилцеллозольв	21160±972*	28585±1379

Примітка. <sup>a</sup> – мг/л; включення  $^3\text{H}$ -тимідину виражали в імп/хв  $\cdot 10^6$  клітин; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

Таблиця 5 – Вплив метилкарбітолу та метилцеллозольву на включення <sup>3</sup>H-уридину в культуру клітин Х-63 (M±m)

Речовина	Концентрація <sup>а</sup>	
	250,0	50,0
Контроль	63830±4483	
Метилкарбітол	39460±2481*	30974±2377*
Метилцеллозольв	45668±3982*	42940±3506*

Примітка. <sup>а</sup> – мг/л; включення <sup>3</sup>H-уридину виражали в імпл/хв • 10<sup>6</sup> клітин; \* – p<0,05 відносно контролю.

Таблиця 6 – Вплив метилкарбітолу та метилцеллозольву на негативний заряд клітинних ядер букального епітелію людини (M±m)

Речовина	Концентрація <sup>а</sup>			
	100,0	10,0	1,0	0,5
Контроль	55,66±2,46			
Метилкарбітол	38,50±2,42*	44,30±1,84*	49,12±3,26	–
Метилцеллозольв	32,12±2,96*	41,24±2,83*	45,38±3,40*	–

Примітка. <sup>а</sup> – мг/л; вплив виражали у % електронегативних ядер; \* – p<0,05 відносно контролю.

**ВИСНОВКИ.** 1. Метилцеллозольв є помірно токсичною речовиною з вираженими кумулятивними властивостями, тоді як метилкарбітол відносять до малотоксичних речовин зі слабо вираженими кумулятивними властивостями.

2. Досліджувані сполуки за умов перорального надходження в організм теплокровних тварин порушують функції ЦНС, дихання та

кровообігу, причому найбільш виражено метилцеллозольв.

3. Метилкарбітол і метилцеллозольв дозозалежно негативно впливають на біологічну активність клітинних культур, інгібують синтез ДНК і РНК у культурі клітин Х-63, знижують негативний заряд ядер букального епітелію.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Елизарова О. Н. Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении / О. Н. Елизарова. – М. : Медицина, 1971. – 173 с.
2. Зулькарнаев Т. Р. Подход к прогнозированию острой токсичности химических веществ / Т. Р. Зулькарнаев, Л. А. Тюрина, Т. С. Соломинова // Гигиена и санитария. – 1999. – № 3. – С. 54–61.
3. Каган Ю. С. Процессы адаптации и кумуляции в организме при воздействии химических соединений / Ю. С. Каган // Профилактическая токсикология. – 1984. – 1. – С. 256–268.
4. Красовский Г. Н. Система критериев комплексной оценки опасности химических веществ, загрязняющих окружающую среду / Г. Н. Красовский, С. Л. Авалиани, З. И. Жолдакова // Гигиена и санитария. – 1992. – № 9–10. – С. 15–17.
5. Красовский Г. Н. Среднее эффективное время гибели животных как параметр для прогнозирования хронической токсичности веществ / Г. Н. Красовский // Гигиена и санитария. – 1982. – № 7. – С. 12–14.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 154 с.
7. Методологія оцінки впливу чинників довкілля на здоров'я населення: вибір типу досліджень і

показників (огляд літератури) / О. І. Тимченко, А. М. Сердюк, О. І. Турос [та ін.] // Журн. АМН України. – 2000. – 6, № 3. – С. 566–574.

8. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко та ін.] – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

9. Попова Л. Д. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / Л. Д. Попова, О. В. Зайцева, Р. И. Кратенко – Х. : Торнадо, 2000. – 437 с.

10. Уосли Д. Новые методы выращивания культуры животных тканей / Д. Уосли. – М. : Мир, 1976. – 255 с.

11. Шахбазов В. Г. Биоэлектрические свойства клеточного ядра, ядрышка и хроматина в функциональной активности ядерного генома / В. Г. Шахбазов. – М. : МГУ, 1982. – Т. 2. – С. 826–828.

12. Lim R. K. A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subacute medium effective doses / R. K. Lim, K. C. Rink, H. G. Class // Arch. Int. Pharmac. Et Ther. – 1971. – 30. – Р. 336–339.

## ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ МЕТИЛКАРБИТОЛА И МЕТИЛЦЕЛЛОЗОЛЬВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

### Резюме

В работе изучена токсичность метилкарбитола и метилцеллозоля, характеризующихся большим объемом производства, широким использованием, поступлением в водные объекты окружающей среды, возможным негативным действием на организм человека. Для теплокровных животных метилцеллозольв является умеренно токсичным веществом с сильно выраженной кумуляцией, метилкарбитол – малотоксичным со слабовыраженными кумулятивными свойствами. При остром отравлении исследуемые соединения нарушают функции ЦНС, дыхания и кровообращения. Культуры клеток J<sub>929</sub> и X-63 более чувствительны к действию веществ, что подтверждается существенным нарушением процесса их распластывания, снижением включения <sup>3</sup>H-тимидина и <sup>3</sup>H-уридина, отрицательного заряда ядер буккального эпителия человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метилкарбитол, метилцеллозольв, токсичность, кумуляция, теплокровные животные, клеточные культуры.

Yu.K. Rezunenko  
KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## EVALUATION OF METHYLCARBITOL AND METHYLCELLOSOLVE TOXICITY WITH USAGE OF DIFFERENT TEST SYSTEMS

### Summary

The study investigates the toxicity of methylcarbitol and methylcellosolve which are characterized by great sizes of production, wide usage, entrance in water objects of environment and possible negative action on the human organism. Methylcellosolve is a moderately toxic substance with pronounced cumulation for the warm blooded animals as well as methylcarbitol is minitoxic with weakly pronounced cumulation. When there is an acute intoxication, the investigative substances disturb functions of CNS, respiration and blood circulation. The cultures of cells J<sub>929</sub> and X-63 are more susceptible to the action of substances which is verified by pronounced disturbances of their spreads and by decrease in <sup>3</sup>H-thymidine and <sup>3</sup>H-uridine inclusion and in negative action of buccal epithelium nucleus of human.

KEY WORDS: methylcarbitol, methylcellosolve, toxicity, cumulation, warm-blooded animals, cellular cultures.

Отримано 02.12.10

Адреса для листування: Ю.К. Резуненко, вул. Іл'їнська, 67, кв. 224, Харків, 61093, Україна.